

528954

Rec'd PCT/PTO 22 MAR 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. April 2004 (15.04.2004)

PCT

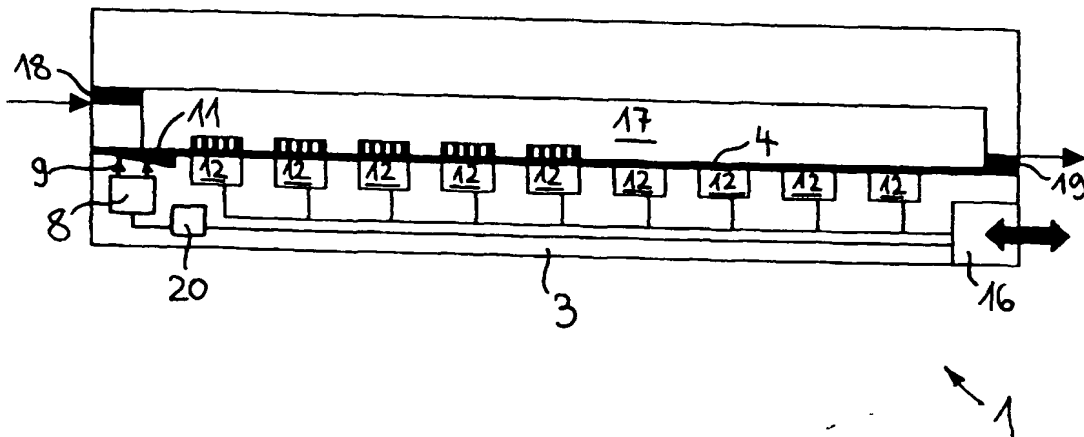
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/031750 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 21/77, 21/55
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MICRONAS GMBH [DE/DE]; Hans-Bunte-Str. 19, 79108 Freiburg i.Br. (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010736
- (22) Internationales Anmeldedatum: 26. September 2003 (26.09.2003)
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEHMANN, Mirko [DE/DE]; Runzstr. 71, 70102 Freiburg (DE). MÜLLER, Claas [DE/DE]; Sonnhalde 12, 79108 Freiburg (DE). KLAPPROTH, Holger [DE/DE]; Kehlerstrasse 12, 79108 Freiburg (DE). FREUND, Ingo [DE/DE]; Obermühlenweg 1, 79235 Vogtsburg-Oberrotweil (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 102 45 435.3 27. September 2002 (27.09.2002) DE
- (74) Anwalt: HUWER, Andreas; Grünwalderstrasse 10-14, 79098 Freiburg i.Br. (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE FOR THE DETECTION OF AT LEAST ONE LIGAND CONTAINED IN A SAMPLE THAT IS TO BE ANALYZED

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR DETEKTION MINDESTENS EINES IN EINER ZU UNTERSUCHENDEN PROBE ENTHALTENEN LIGANDEN



(57) Abstract: Disclosed is a device (1) for detecting at least one ligand (2) contained in a sample that is to be analyzed. Said device comprises an optical waveguide (4), on the surface of which at least one ligand(2)-specific receptor (5) is directly or indirectly immobilized. The ligand (2) bonds to said receptor (5) during contact therewith. The inventive device (1) comprises at least one optical source of radiation (8) for injecting excitation radiation (9) into the waveguide (4), the radiation (9) being used for exciting emission of luminescence radiation (10) in accordance with the bonding of the ligand (2) to the receptor (5). At least one radiation receiver (12) is integrated into the semiconductor substrate of a semiconductor chip (3) so as to detect the luminescence radiation. The waveguide (4) is integrated in a monolithic manner into the semiconductor substrate or is applied thereupon as a wave-guiding layer.

(57) Zusammenfassung: Eine Vorrichtung (1) zur Detektion mindestens eines in einer zu untersuchenden Probe enthaltenen Liganden (2) weist einen optischen Wellenleiter (4) auf, an dessen Oberfläche wenigstens ein für den Liganden (2) spezifischer Rezeptor (5) direkt oder indirekt immobilisiert ist. Der Ligand (2) bindet beim Kontaktieren des Rezeptors (5) an diesen. Die Vorrichtung (1) hat mindestens eine

BEST AVAILABLE COPY

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/031750 A1



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

optische Strahlungsquelle (8) zur Einkoppelung von Anregungsstrahlung (9) in den Wellenleiter (4). Die Strahlung (9) dient zur Anregung der Emission von Lumineszenzstrahlung (10) in Abhängigkeit von der Bindung des Liganden (2) an den Rezeptor (5). Zur Detektion der Lumineszenzstrahlung (10) ist in das Halbleitersubstrat eines Halbleiterchips (3) mindestens ein Strahlungsempfänger (12) integriert. Der Wellenleiter (4) ist monolithisch mit dem Halbleitersubstrat integriert oder als Wellenleiterschicht auf dieses aufgebracht.

Vorrichtung zur Detektion mindestens eines in einer zu untersuchenden Probe enthaltenen Liganden

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Detektion mindestens eines in einer zu
5 untersuchenden Probe enthaltenen Liganden, mit einem optischen Wellenleiter, an
dessen Oberfläche wenigstens ein Rezeptor direkt oder indirekt immobilisiert ist, der
beim Kontaktieren des Liganden eine spezifische Bindung mit dem Liganden
eingeht, mit mindestens einer optischen Strahlungsquelle zur Einkoppelung von
10 Anregungsstrahlung in den Wellenleiter, zur Anregung der Emission von Lumines-
zenzstrahlung in Abhängigkeit von der Bindung des Liganden an den Rezeptor,
und mit einem Halbleiterchip, der wenigstens einen auf einem Halbleitersubstrat
angeordneten Strahlungsempfänger zur Detektion der Lumineszenzstrahlung
aufweist.

15 Eine derartige Vorrichtung ist aus DE 100 02 566 A1 bekannt. Sie weist an der
Oberfläche eines planaren Licht-Wellenleiters mehrere Messstellen auf, an denen
als Rezeptoren spezifische Nukleinsäuren immobilisiert sind. Mit den Rezeptoren
wird eine zu untersuchende flüssige Probe in Kontakt gebracht, die zu den Rezepto-
ren komplementäre Nukleinsäuren enthält. Diese binden jeweils an die dazu
20 passenden spezifischen Rezeptoren. Die so gebildeten, die zueinander komple-
mentären Nukleinsäuren aufweisenden Rezeptor-Liganden-Komplexe werden mit
einem Lumineszenzstoff markiert. Mit Hilfe z.B. einer Laserdiode wird eine Anre-
gungsstrahlung erzeugt und in den Licht-Wellenleiter eingekoppelt. Durch Totalre-
flexion an der Grenzfläche des Wellenleiters wird in einer an die Grenzfläche
25 angrenzenden Schicht der Probe ein elektromagnetisches Feld erzeugt, das
sogenannte Evaneszenzfeld. Dieses dringt nur einige hundert Nanometer von der
Grenzfläche in die flüssige Probe ein. Durch das Evaneszenzfeld werden nahezu
ausschließlich die an der Oberfläche des Wellenleiters gebundenen Lumines-
zenzstoffe zur Abgabe von Lumineszenzstrahlung angeregt. Zum Nachweis der in
30 der Probe enthaltenen Nukleinsäuren wird die Lumineszenzstrahlung mit Hilfe einer
CCD-Kamera orts aufgelöst detektiert. Die CCD-Kamera ist an der den Rezeptoren
abgewandten Rückseite des Wellenleiters angeordnet. Sie weist eine Abbildungs-
optik auf, welche die einzelnen, an der Oberfläche des Wellenleiters befindlichen

Messstellen jeweils auf ein Detektorelement eines CCD-Sensors abbildet. Die Vorrichtung hat den Nachteil, dass sie noch relativ viele Systemkomponenten aufweist und daher entsprechend teuer ist. Ungünstig ist außerdem, dass die Vorrichtung vergleichsweise große Abmessungen aufweist. Schließlich ist auch die

5 Messempfindlichkeit der Vorrichtung noch verbesserungsfähig.

Es besteht deshalb die Aufgabe, eine Vorrichtung der eingangs genannten Art zu schaffen, die bei einem einfachen und kostengünstigen Aufbau eine kompakte Baugröße ermöglicht.

10 Die Lösung dieser Aufgabe besteht darin, dass der Wellenleiter monolithisch mit dem Halbleitersubstrat integriert ist oder als Wellenleiterschicht auf dem Halbleiterchip angeordnet ist.

15 Der mindestens eine Strahlungsempfänger ist dann direkt an der dem Rezeptor abgewandten Rückseite des Wellenleiters und somit in entsprechend geringem Abstand zu dem wenigstens einen Rezeptor angeordnet. Somit ergibt sich eine sehr kompakte und flache Vorrichtung, die beispielsweise die Form eines Plättchens aufweisen kann. Aufgrund des geringen Abstands zwischen dem Rezeptor

20 und dem Strahlungsempfänger kann eine aufwändige und teure Abbildungsoptik zwischen dem Rezeptor und dem Strahlungsempfänger eingespart werden. Die von einem an dem Rezeptor angelagerten Lumineszenzstoff emittierte Lumineszenzstrahlung kann in einem großen Raumwinkelsegment detektiert werden. Es ergibt sich also eine einfach aufgebaute, kostengünstig herstellbare Vorrichtung mit

25 großer Messempfindlichkeit. Unter Lumineszenz werden alle Emissionen von Strahlungsquanten verstanden, vor allem Leuchterscheinungen, wie Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, die Stoffe nach quantenhafter Anregung zeigen.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erstreckt sich der Wellenleiter

30 bis über den wenigstens einen Strahlungsempfänger, wobei der wenigstens eine Rezeptor vorzugsweise dem Strahlungsempfänger direkt gegenüberlegend an der Oberfläche des Wellenleiters angeordnet ist. Die von einem an den Rezeptor gebundenen Liganden oder einem an diesem angeordneten Lumineszenzstoff ausgesandte Lumineszenzstrahlung verläuft dann etwa orthogonal zur Erstreckungsrichtung des Wellenleiters, wodurch eine gute Übertragung der Lumineszenzstrahlung durch den Wellenleiter hindurch in den Strahlungsempfänger

35

erreicht wird. Die Lumineszenzstrahlung wird also ohne Umwege direkt zu dem Strahlungsempfänger geleitet, wodurch eine hohe Detektionsempfindlichkeit der Vorrichtung ermöglicht wird.

- 5 Vorteilhaft ist, wenn die Wellenleiterschicht direkt an den Halbleiterchip angrenzt, und wenn die Topographie des Halbleiterchips in dem an den Wellenleiter angrenzenden Halbleiterchip-Bereich derart ausgebildet ist, dass die dem wenigstens einen Rezeptor gegenüberliegende Grenzfläche zwischen dem Halbleiterchip und dem Wellenleiter zwischen zwei parallel zur Erstreckungsebene des Halbleiterchips angeordneten Ebenen verläuft, deren Abstand kleiner ist als die Wellenlänge der Anregungsstrahlung, insbesondere kleiner als die Hälfte, vorzugsweise ein Viertel und gegebenenfalls ein Achtel der Wellenlänge der Anregungsstrahlung. Im Bereich des Wellenleiters ist also die Topographie des Halbleiterchips im Wesentlichen eben ausgebildet ist, was eine verlustarme Führung der Anregungsstrahlung in dem Wellenleiter ermöglicht. In entsprechender Weise kann auch die den Rezeptoren zugewandte Grenzfläche des Wellenleiters zwischen zwei parallel zur Erstreckungsebene des Halbleiterchips angeordneten Ebenen verlaufen, deren Abstand kleiner ist als die Wellenlänge der Anregungsstrahlung, insbesondere kleiner als die Hälfte, vorzugsweise ein Viertel und gegebenenfalls ein Achtel der Wellenlänge der Anregungsstrahlung. An der Grenzfläche zu dem Wellenleiter kann der Halbleiterchip eine Oxidschicht aufweisen.

- Bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist zwischen dem Halbleiterchip und dem Wellenleiter eine Zwischenschicht angeordnet, deren optischer Brechungsindex kleiner ist als derjenige des Wellenleiters, wobei die Zwischenschicht an ihrer dem Halbleiterchip zugewandten und an diesem anliegenden Rückseite eine Negativform der Oberflächenstruktur des Halbleiterchips aufweist und wobei die die Grenzfläche zu dem Wellenleiter bildende Vorderseite der Zwischenschicht im Wesentlichen eben ausgebildet ist. Dabei ist es sogar möglich, dass sich der Wellenleiter durchgängig oder unterbrechungsfrei über den wenigstens einen Strahlungsempfänger und/oder die Strukturen für die elektronische Schaltung erstreckt. Bei der Herstellung der Vorrichtung wird die Zwischenschicht vorzugsweise dadurch erzeugt, dass zunächst der Halbleiterchip mit dem wenigstens einen Strahlungsempfänger und gegebenenfalls den Strukturen für die elektronische Schaltung auf einem Wafer gefertigt wird, und dass danach ein den Werkstoff für die Zwischenschicht enthaltendes flüssiges Medium im Schleuderver-

fahren auf den Wafer aufgebracht wird. Nachdem sich das Medium durch die Fliehkraft gleichmäßig auf dem Wafer verteilt hat, wird es zu der Zwischenschicht verfestigt. Auf diese wird dann der Wellenleiter aufgebracht. Das Medium kann ein flüchtiges Lösungsmittel, wie z.B. Toluol, und ein Polymer, wie z.B. PMMA enthalten. Als flüssiges Medium kann aber auch Spin-On-Glas verwendet werden.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist die Zwischenschicht als Klebstoffschicht ausgebildet ist, vorzugsweise als Polymerschicht. Der Wellenleiter kann dann als Kunststoff-Spritzgussteil kostengünstig in großer Stückzahl hergestellt werden. Der Wellenleiter kann ein dünnes Kunststoff- oder Glasplättchen sein, das bei der Herstellung der Vorrichtung auf das Halbleitersubstrat aufgeklebt wird. Dabei kann der Wellenleiter auch die Funktion einer Schutzabdeckung für den Halbleiterchip erfüllen. Der Wellenleiter kann sich gegebenenfalls über den gesamten Halbleiterchip erstrecken.

Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist der Wellenleiter über wenigstens eine Bondstelle mit dem Halbleiterchip verbunden. Auch bei dieser Ausführungsform kann der Wellenleiter ein dünnes Kunststoffplättchen sein, das vorzugsweise eine Dicke von weniger als einem Millimeter aufweist.

Bei einer zweckmäßigen Ausgestaltung der Erfindung ist der Wellenleiter als Dünnschicht ausgebildet, die vorzugsweise aus einem transparenten Polymerwerkstoff besteht, insbesondere aus Polystyrol. Dabei ist der wenigstens eine Rezeptor vorzugsweise unmittelbar auf der Dünnschicht angeordnet. Der Wellenleiter kann aber auch aus einem anderen Werkstoff bestehen, beispielsweise aus Spin-On-Glas. Mit Hilfe der Dünnschichttechnik lässt sich der Wellenleiter mit einer Dicke von weniger als 100 Mikrometern herstellen. Auf den Strahlungsempfänger trifft dann ein entsprechend großer Anteil der von dem an den Rezeptor gebundenen Lumineszenzstoff abgegebenen Lumineszenzstrahlung auf. Für den Nachweis des Liganden in der Probe wird somit nur eine geringe Probenmenge benötigt. Bei der Herstellung der Vorrichtung kann der Wellenleiter durch Tauchbeschichten oder im Schleuderverfahren auf einfache Weise auf den Halbleiterchip aufgebracht werden.

Bei einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist der Wellenleiter durch eine Metalloxidschicht gebildet, insbesondere eine Siliziumdioxidschicht (SiO_2)

oder eine Tantalpentoxidschicht (Ta_2O_5). Der Wellenleiter lässt sich dann mit Hilfe von Standardprozessen der Halbleiterfertigung, wie z.B. durch Plasmaoxidation oder Chemical Vapour Deposition (CVD), kostengünstig herstellen. Dabei kann die Dicke des Wellenleiters weniger als 10 Mikrometer betragen, so dass nahezu die Hälfte der von einem an der Oberfläche des Wellenleiters gebundenen Lumineszenzstoff emittierten Lumineszenzstrahlung auf den Strahlungsempfänger auftrifft. Es ergibt sich also eine entsprechend hohe Messempfindlichkeit, weshalb für die Untersuchung der Probe bereits kleinste Mengen Probenmaterial ausreichen. Die Oxidschicht kann eine Oberflächenstruktur haben, an welcher der wenigstens eine Rezeptor unmittelbar anhaften kann. Dadurch kann eine Haftvermittlerschicht zwischen dem Wellenleiter und dem wenigstens einen Rezeptor eingespart werden. Es ist aber auch möglich, dass der Wellenleiter als Silizium-Nitrid-Schicht (Si_3N_4) ausgebildet ist.

Besonders vorteilhaft ist, wenn die optische Strahlungsquelle als Halbleiterstrahlungsquelle ausgebildet und in den in den Halbleiterchip integriert ist. Die Vorrichtung ermöglicht dann einen noch kompakteren und kostengünstigeren Aufbau. Die Halbleiterstrahlungsquelle kann eine Laserdiode oder eine Leuchtdiode sein, welche die Anregungsstrahlung vorzugsweise in einem schmalbandigen Wellenlängenbereich emittiert, in dem der wenigstens eine Strahlungsempfänger unempfindlich ist.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist zum Einkoppeln der Anregungsstrahlung in den Wellenleiter im Abstrahlbereich der optischen Strahlungsquelle eine Einkoppeloptik vorgesehen, die vorzugsweise einstückig mit dem Wellenleiter ausgebildet ist und insbesondere wenigstens ein Prisma, ein optisches Gitter und/oder einen Umlenkspiegel aufweist. Die Strahlungsquelle kann an der den Rezeptoren abgewandten Rückseite des Wellenleiters mit ihrer Abstrahlseite der Einkoppeloptik des Wellenleiters zugewandt angeordnet sein. An der Einkoppeloptik wird dabei die von der Strahlungsquelle ausgesandte Anregungsstrahlung derart abgelenkt, dass sie unter einem Winkel in den Wellenleiter eintritt, der so gewählt ist, dass die Strahlung unter Ausnutzung der Totalreflexion in dem Wellenleiter geführt wird. Somit ergibt sich eine verlustarme Führung der Anregungsstrahlung von der Strahlungsquelle zu dem wenigstens einen Rezeptor.

Vorteilhaft ist, wenn mehrere Strahlungsempfänger vorzugsweise zeilen- oder matrixförmig nebeneinander in das Halbleitersubstrat integriert sind, wenn im Detektionsbereich der einzelnen Strahlungsempfänger jeweils mindestens ein, wenigstens einen Rezeptor aufweisendes Detektionsfeld angeordnet ist. Die

5 Vorrichtung ermöglicht dann eine orts aufgelöste Detektion von an der Oberfläche des Wellenleiters befindlichen Rezeptor-Liganden-Komplexen. Dabei können die einzelnen Detektionsfelder unterschiedliche Rezeptoren aufweisen, so dass die Probe gleichzeitig auf das Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher Liganden untersucht werden kann. Es ist aber auch denkbar, dass mindestens eine Gruppe

10 von Detektionsfeldern die gleichen Rezeptoren aufweist. Die Messwerte der einzelnen Strahlungsempfänger der Gruppe können dann gemittelt, gefiltert und/oder zu Kontrollzwecken miteinander verglichen werden. Wenn mit Hilfe der Vorrichtung die Konzentration des Liganden in der Probe bestimmt werden soll, ist es vorteilhaft, wenn die Rezeptoren von wenigstens zwei Detektionsfeldern eine

15 unterschiedliche Affinität zu dem Liganden aufweisen. Die Konzentration des Liganden kann dann in einem breiten Konzentrationsbereich gemessen werden, ohne dass die Probe für die Messung verdünnt oder aufkonzentriert werden muss. Der Wellenleiter kann sich unterbrechungsfrei über die Strahlungsempfänger erstrecken. Dadurch kann bei der Herstellung des Wellenleiters ein Maskierungsschritt eingespart werden.

20

Zweckmäßigerweise sind die Detektionsfelder derart voneinander beabstandet und relativ zu den Strahlungsempfängern positioniert, dass die einzelnen Strahlungsempfänger im Wesentlichen keine Lumineszenzstrahlung von einem Detektionsfeld eines anderen Strahlungsempfängers empfangen. Somit wird eine hohe Übersprechdämpfung zwischen den aus den einzelnen Detektionsfeldern und den

25 diesen jeweils zugeordneten Strahlungsempfängern bestehenden Messanordnungen erreicht.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist der wenigstens eine Rezeptor in der Innenhöhlung einer Durchflussmesskammer angeordnet, die zumindest eine Einlass- und eine Auslassöffnung aufweist, wobei das Halbleitersubstrat vorzugsweise einen Wandungsbereich der Durchflussmesskammer bildet. In der Durchflussmesskammer können dann Biomoleküle oder Biokomponenten

30 untersucht und über die Ein- und Auslassöffnung mit einer Nährlösung versorgt werden. Das Biomolekül kann Nukleinsäuren oder Derivate davon (DNA, RNA, PNA,

35

LNA, Oligonukleotide, Plasmide, Chromosomen), Peptide, Proteine (Enzym, Protein, Oligopeptide, zelluläre Rezeptorproteine und deren Komplexe, Peptidhormone, Antikörper und deren Fragmente), Kohlenhydrate und deren Derivate, insbesondere glykosylierte Proteine und Glycoside, Fette, Fettsäuren und/oder Lipide umfassen.

5

Zum Temperieren der Durchflussmesskammer kann eine Heiz- und/oder Kühlvorrichtung vorgesehen sein, die vorzugsweise ein Peltier-Element aufweist. Die Heizvorrichtung ist vorzugsweise als Dünnschichtheizung ausgebildet. Die Vorrichtung kann dann mehrfach verwendet werden, indem nach Durchführung einer Messung die Temperatur in der Durchflussmesskammer soweit erhöht wird, dass sich
10 sämtliche an die Rezeptoren gebundenen Liganden von den Rezeptoren ablösen. Die Liganden können dann durch Zuführen eines Spülmediums über die Auslassöffnung aus der Durchflussmesskammer herausgespült werden. Dabei wird der Spülvorgang solange aufrechterhalten, bis die Strahlungsempfänger keine Lumineszenzstrahlung mehr detektieren. Danach kann über die Einlassöffnung eine
15 neue Probe in die Durchflussmesskammer eingebracht und untersucht werden. Die Vorrichtung kann aber auch zur Bestimmung des Schmelzpunktes und/oder der Bindungskonstanten eines Liganden, wie z.B. einer DNA-Sequenz, verwendet werden. Dabei wird die Anbindung des Liganden an die Rezeptoren als Funktion
20 der Temperatur und/oder der Zeit gemessen. Aus der so erhaltenen Schmelzkurve kann der Schmelzpunkt der DNA-Sequenz, also die Temperatur, bei der die Hälfte einer ursprünglich doppelsträngigen DNA-Sequenz einzelsträngig vorliegt, ermittelt werden. Anhand des Schmelzpunktes können Mutationen in DNA-Sequenzen, die beispielsweise bei Erbkrankheiten auftreten können, erkannt werden.

25

Bei einer zweckmäßigen Ausgestaltung der Erfindung ist in der Durchflussmesskammer wenigstens ein Reagenz und/oder Reaktionspartner zum Nachweisen der Bindung des wenigstens einen Liganden an den mindestens einen Rezeptor deponiert. Die Durchflussmesskammer ist dann fertig für die Verwendung, d.h. für
30 die Messung braucht nur noch die zu untersuchende Probe über die Einlassöffnung in die Messkammer eingefüllt zu werden. Das Reagenz und/oder der Reaktionspartner ist vorzugsweise lyophilisiert und kann beispielsweise auf die Innenwand der Messkammer aufgedruckt sein. Vorzugsweise ist dabei ein stabilisierendes Agens, wie. z.B. Trehalose, Poly (2-hydroxyethyl) methacrylat (pHEMA) oder bovines
35 Serum Albumin (BSA), vorgesehen.

Nachfolgend sind Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen zum Teil stärker schematisiert:

Fig. 1 einen Querschnitt durch eine Vorrichtung zur Detektion von in einer zu untersuchenden Probe enthaltenen Liganden, mit einer Durchflussmesskammer,

Fig. 2 und 7 einen Querschnitt durch einen optischen Wellenleiter aufweisenden Wandungsbereich der Durchflussmesskammer, wobei auf dem Wellenleiter Rezeptoren immobilisiert sind, an die Liganden gebunden sind, die indirekt mit einem Lumineszenzstoff markiert sind,

Fig. 3 eine Darstellung ähnlich Fig. 2, wobei der Lumineszenzstoff mit Hilfe von Anregungs-Strahlung zur Abgabe von Lumineszenz-Strahlung angeregt wird und wobei die Anregungs- und die Lumineszenz-Strahlung schematisch in Form von Strahlen dargestellt sind,

Fig. 5 eine Aufsicht auf einen Teilbereich eines Halbleiterchips,

Fig. 6 einen Querschnitt durch einen Teilbereich des Halbleiterchip und den darauf angeordneten Wellenleiter, und

Fig. 7 eine Darstellung ähnlich Fig. 6, wobei jedoch zwischen dem Wellenleiter und dem Halbleiterchip eine Zwischenschicht angeordnet ist.

Eine im Ganzen mit 1 bezeichnete Vorrichtung zur Detektion mindestens eines in einer zu untersuchenden, im wesentlichen flüssigen Probe enthaltenen Liganden 2 weist einen Halbleiterchip 3 auf, der mit Methoden der Halbleitertechnik mit einem optischen Wellenleiter 4 integriert ist (Fig. 1). Der Wellenleiter kann beispielsweise aus einem Polymerwerkstoff bestehen.

In Fig. 2 ist erkennbar, dass an der Oberfläche des Wellenleiters 4 Rezeptoren 5 immobilisiert, die beim Kontaktieren des Liganden 2 an diesen binden. Die Immobilisierung der Rezeptoren 5 kann beispielsweise durch eine Silanisierung oder eine auf dem Wellenleiter 4 angeordnete Polyimidschicht erreicht werden, an welcher

die Rezeptoren 5 anhaften. Die Rezeptoren 5 können auf den Wellenleiter 4 bzw. die darauf befindliche Polyimidschicht aufgedruckt sein. Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 2 sind die Rezeptoren 5 Antikörper gegen ein bestimmtes Epitop des Liganden 2. Nach Bindung des Epitops an den Rezeptor 5 wird der so gebildete, aus dem Epitop und dem Rezeptor 5 bestehende Antikörperkomplex mittels eines zweiten, an das erste Epitop bindenden Antikörpers 6 markiert. Dieser Antikörper 6 ist direkt oder indirekt mit einem Lumineszenzstoff 7 markiert.

In Fig. 1 ist erkennbar, dass in den Halbleiterchip 3 eine optische Halbleiter-Strahlungsquelle 8, wie zum Beispiel eine Laser- oder Leuchtdiode, integriert ist. Das Spektrum der von der Strahlungsquelle 8 emittierten Strahlung 9 weist mindestens eine Anregungswellenlänge auf, bei welcher der Lumineszenzstoff 7 zur Abgabe von Lumineszenzstrahlung 10 angeregt wird. Zum Einkoppeln der Anregungsstrahlung 9 in den Wellenleiter 4 ist im Abstrahlbereich der Strahlungsquelle 8 eine Einkoppeloptik 11 vorgesehen ist, die in der Zeichnung nicht näher dargestellte Mikroprismen aufweist, welche die von der Strahlungsquelle 8 ausgesandte Anregungsstrahlung derart umlenken, dass sie unter Ausnutzung der Totalreflexion in dem Wellenleiter 4 geführt ist. Durch die Totalreflexion an der Grenzfläche des Wellenleiters 4 wird in dem optisch dünneren Medium, nämlich der Probe, ein elektromagnetisches Evaneszenzfeld erzeugt, wodurch die an der Oberfläche des Wellenleiters 4 gebundenen Lumineszenzstoffe 7 zur Abgabe der Lumineszenzstrahlung 10 angeregt werden. Da das Evaneszenzfeld nur einige hundert Nanometer tief in die Probe eindringt, werden nahezu ausschließlich die an der Oberfläche des Wellenleiters gebundenen Lumineszenzstoffe 7 zur Abgabe der Lumineszenzstrahlung 10 angeregt, während in der Probe enthaltene ungebundene Lumineszenzstoffe 7 praktisch nicht zu der Lumineszenzstrahlung beitragen.

Zur Detektion der Lumineszenzstrahlung 10 sind mehrere, jeweils als Halbleiterbauelemente ausgebildete optische Strahlungsempfänger 12 in den Halbleiterchip 3 integriert. Die Strahlungsempfänger 12 sind an der den Rezeptoren 5 abgewandten Rückseite des für die Lumineszenzstrahlung 10 durchlässigen Wellenleiters 4 angeordnet. Die Lumineszenzstrahlung 10 trifft also ohne Zwischenschaltung einer Abbildungsoptik direkt auf die Strahlungsempfänger 12 auf. Die Vorrichtung weist dadurch einen kompakten und kostengünstigen Aufbau auf.

Bei dem Lumineszenzstoff 7 handelt es sich um einen aufwärtskonvertierenden Lumineszenzstoff. Derartige Lumineszenzstoffe sind aus EP 0 723 146 A1 bekannt. Als Beispiele für aufwärtskonvertierende Lumineszenzstoffe seien die Farbstoff BND der Dyomics GmbH, Jena und IR-140 erwähnt. Anders als abwärtskonvertierende Lumineszenzstoffe beziehen aufwärtskonvertierende Lumineszenzstoffe die für die Quantenemission benötigte Energie nicht aus einem einzigen sondern aus mehreren Quanteneffekten. Abwärtskonvertierende Lumineszenzstoffe weisen daher im Vergleich zu abwärtskonvertierenden Lumineszenzstoffen eine wesentlich größere Stokes-Verschiebung auf, bei welcher die Wellenlänge der Anregungsstrahlung beispielsweise etwa doppelt so groß sein kann wie die Wellenlänge der Lumineszenz-Strahlung. Dadurch ist es möglich, als Strahlungsquelle eine Infrarot-Halbleiter-Strahlungsquelle 8 vorzusehen, die bei kompakten Abmessungen eine hohe Strahlungsintensität ermöglicht. Das Infrarotlicht derartiger Halbleiter-Strahlungsquellen 8 hat außerdem den Vorteil, dass gegenüber kurzwelligerer optischer Strahlung weniger Streueffekte auftreten. Mit Hilfe des aufwärtskonvertierenden Lumineszenzstoffs 7 kann die von der Strahlungsquelle 8 abgegebene optische Strahlung in sichtbares Licht oder in nahes Infrarot-Licht konvertiert werden, für das die Strahlungsempfänger 12 eine hohe Detektionsempfindlichkeit aufweisen. Für die Anregungsstrahlung 9 sind die Strahlungsempfänger 12 unempfindlich.

In Fig. 2 und 3 ist erkennbar, dass sich der Wellenleiter 4 bis über die Strahlungsempfänger 12 erstreckt und dass die Rezeptoren 5 dem Strahlungsempfänger 12 direkt gegenüberliegend an der Oberfläche des Wellenleiters 4 angeordnet sind. Somit kann die Lumineszenzstrahlung 10 auf direktem Wege von dem Lumineszenzstoff 7 zu den Strahlungsempfängern 12 gelangen.

Bei dem in Fig. 4 und 5 gezeigten Ausführungsbeispiel grenzt der Wellenleiter 4 direkt an den Halbleiterchip 3 an. Der Wellenleiter 4 weist Unterbrechungen auf, in denen Strukturen 13 für eine elektronische Schaltung angeordnet sind. Diese weist Leiterbahnen auf, die mit den Strahlungsempfängern 12 verbunden sind. Die Topographie des Halbleiterchips in dem an den Wellenleiter 4 angrenzenden Halbleiterchip-Bereich derart ausgebildet ist, dass die den Rezeptoren 5 gegenüberliegende Grenzfläche 14 zwischen dem Halbleiterchip 3 und dem Wellenleiter 4 zwischen zwei gedachten, jeweils parallel zur Erstreckungsebene des Halbleiterchips 3 angeordneten Ebenen 14a, 14b verläuft, deren Abstand x kleiner ist als ein Achtel der Wellenlänge der Anregungsstrahlung 9. Dadurch wird eine unerwünsch-

te Lichtauskopplung aus dem Wellenleiter 4 an der Grenzfläche 14 weitestgehend vermieden. Strukturen, die eine von einer Ebene abweichende Oberflächen-Topographie des Halbleiterchips 3 erfordern, wie zum Beispiel Leiterbahnen aus Aluminium, sind im Wesentlichen seitlich neben dem Wellenleiter 4 angeordnet. Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 5 ist der Wellenleiter 4 durch eine Halbmetalloxid-Schicht gebildet, die sich in einem oberflächennahen Bereich flächig auf einem Halbleitersubstrat 3 des Halbleiterchips 3 erstreckt und etwa parallel zur Erstreckungsebene des Halbleitersubstrats verläuft. Das Halbleitersubstrat kann beispielsweise aus Silizium bestehen.

Bei dem Ausführungsbeispiel nach Fig. 6 ist zwischen dem Halbleiterchip 3 und dem Wellenleiter 4 eine Zwischenschicht 15 angeordnet ist, die etwa parallel zur Erstreckungsebene des Halbleiterchips 3 verläuft und deren optischer Brechungsindex kleiner ist als derjenige des Wellenleiters 4. Die Zwischenschicht 15 grenzt direkt den Halbleiterchip 3 an und weist eine Negativform des Halbleiterchips 3 auf. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass der Werkstoff für die Zwischenschicht 15 bei der Herstellung der Vorrichtung 1 in verflüssigter Form im Schleuderverfahren auf den Halbleiterchip 3 aufgetragen und - nachdem er sich gleichmäßig über die Oberfläche des Halbleiterchips 3 verteilt hat - verfestigt wird. An ihrer dem Halbleiterchip 3 abgewandten Seite ist die Zwischenschicht 15 eben ausgebildet. Auf die Zwischenschicht 15 ist als weitere Schicht der Wellenleiter 4 aufgebracht. Es ergibt sich also eine ebene Grenzfläche zwischen der Zwischenschicht 15 und dem Wellenleiter 4, die eine weitestgehend verlustfreie Führung der Anregungsstrahlung 9 in dem Wellenleiter 4 ermöglicht. Dabei kann sich der Wellenleiter 4 durchgängig über den Halbleiterchip 3 erstrecken.

In Fig. 1 ist erkennbar, dass die Strahlungsempfänger 12 über Leiterbahnen mit einer in den Halbleiterchip 3 integrierten Ansteuerungs- und Auswerteeinrichtung 17 verbunden sind. Die Auswerteeinrichtung 17 hat eine in der Zeichnung schematisch dargestellte Schnittstelleneinrichtung zum Verbinden mit einer übergeordneten Anzeige- und/oder Auswerteeinheit, beispielsweise einem Mikrocomputer.

In Fig. 7 ist erkennbar, dass mehrere Strahlungsempfänger 12 matrixförmig nebeneinander in das Halbleitersubstrat integriert sind. Im Detektionsbereich der einzelnen Strahlungsempfänger 12 ist jeweils ein Detektionsfeld mit mehreren Rezeptoren

5 angeordnet. Die einzelnen Detektionsfelder haben unterschiedliche Rezeptoren 5, die jeweils mit einem bestimmten Liganden 2 eine Bindung eingehen können.

5 In Fig. 2 bis 4 sind die Rezeptoren gegenüber den Strahlungsempfängern 12 vergrößert dargestellt. Die Abstände zwischen zueinander benachbarten Detektionsfeldern einerseits und die Abstände zwischen den an die Rezeptoren 5 gebundenen Lumineszenzstoffen 7 und den ihnen jeweils zugeordneten Strahlungsempfängern 12 andererseits sind so gewählt, dass die einzelnen Strahlungsempfänger 12 im Wesentlichen keine Lumineszenzstrahlung von einem Detektionsfeld eines
10 benachbarten Strahlungsempfängers empfangen können.

In Fig. 1 ist erkennbar, dass der Halbleiterchip 3 einen Wandungsbereich einer Durchflussmesskammer bildet, in deren Innenhöhlung 17 die Rezeptoren 5 angeordnet sind. Die Durchflussmesskammer hat eine Einlassöffnung 19 und eine
15 Auslassöffnung 19. Die Einlassöffnung 19 ist mit einer in der Zeichnung nicht näher dargestellten Zuleitung für die Probe und die Auslassöffnung 19 mit einer Ableitung verbunden.

Erwähnt werden soll noch, dass die Strahlungsquelle 8 zum Modulieren der
20 Anregungsstrahlung 9 mit einer Modulationseinrichtung 20 verbunden ist, die in den Halbleiterchip 3 integriert ist. Mit Hilfe der Modulationseinrichtung 20 kann die Anregungsstrahlung 9 beispielsweise getaktet ein- und ausgeschaltet werden, um in den Messsignalen der Strahlungsempfänger 12 eventuell enthaltene, durch Streulicht oder unspezifische optische Anregung verursachte Signalanteile bei der
25 Signalauswertung berücksichtigen zu können. Die Modulationseinrichtung 20 ist zu diesem Zweck über eine Verbindungsleitung mit der Auswerteeinrichtung 16 verbunden.

Die Vorrichtung 1 zur Detektion mindestens eines in einer zu untersuchenden Probe
30 enthaltenen Liganden 2 weist also einen optischen Wellenleiter 4 auf, an dessen Oberfläche wenigstens ein für den Liganden 2 spezifischer Rezeptor 5 direkt oder indirekt immobilisiert ist. Der Ligand 2 bindet beim Kontaktieren des Rezeptors 5 an diesen. Die Vorrichtung 1 hat mindestens eine optische Strahlungsquelle 8 zur Einkoppelung von Anregungsstrahlung 9 in den Wellenleiter 4. Die Strahlung 9
35 dient zur Anregung der Emission von Lumineszenzstrahlung 10 in Abhängigkeit von der Bindung des Liganden 2 an den Rezeptor 5. Zur Detektion der Lumines-

zenzstrahlung 10 ist in das Halbleitersubstrat eines Halbleiterchips 3 mindestens ein Strahlungsempfänger 12 integriert. Der Wellenleiter 4 ist monolithisch mit dem Halbleitersubstrat integriert oder als Wellenleiterschicht auf dieses aufgebracht.

Patentansprüche

1. Vorrichtung (1) zur Detektion mindestens eines in einer zu untersuchenden Probe enthaltenen Liganden (2), mit einem optischen Wellenleiter (4), an dessen Oberfläche wenigstens ein Rezeptor (5) direkt oder indirekt immobilisiert ist, der beim Kontaktieren des Liganden (2) eine spezifische Bindung mit dem Liganden (2) eingeht, mit mindestens einer optischen Strahlungsquelle (8) zur Einkoppelung von Anregungsstrahlung (9) in den Wellenleiter (4), zur Anregung der Emission von Lumineszenzstrahlung (10) in Abhängigkeit von der Bindung des Liganden (2) an den Rezeptor (5), und mit einem Halbleiterchip (3), der wenigstens einen auf einem Halbleitersubstrat angeordneten Strahlungsempfänger (12) zur Detektion der Lumineszenzstrahlung (10) aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Wellenleiter (4) monolithisch mit dem Halbleitersubstrat integriert ist oder als Wellenleiterschicht auf dem Halbleiterchip (3) angeordnet ist.
2. Vorrichtung (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich der Wellenleiter (4) bis über den wenigstens einen Strahlungsempfänger (12) erstreckt und dass der wenigstens eine Rezeptor (5) vorzugsweise dem Strahlungsempfänger (12) direkt gegenüberliegend an der Oberfläche des Wellenleiters (4) angeordnet ist.
3. Vorrichtung (1) nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Wellenleiterschicht direkt an den Halbleiterchip (3) angrenzt, dass die Topographie des Halbleiterchips (3) in dem an den Wellenleiter (4) angrenzenden Halbleiterchip-Bereich derart ausgebildet ist, dass die dem wenigstens einen Rezeptor (5) gegenüberliegende Grenzfläche (14) zwischen dem Halbleiterchip (3) und dem Wellenleiter (4) zwischen zwei parallel zur Erstreckungsebene des Halbleiterchips (3) angeordneten Ebenen (14a, 14b) verläuft, deren Abstand (x) kleiner ist als die Wellenlänge der Anregungsstrahlung (9), insbesondere kleiner als die Hälfte, vorzugsweise ein Viertel und gegebenenfalls ein Achtel der Wellenlänge der Anregungsstrahlung (9).
4. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Halbleiterchip (3) seitlich neben dem Wellenleiter (4) Strukturen (13) für eine elektronische Schaltung aufweist.

5. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem Halbleiterchip (3) und dem Wellenleiter (4) eine Zwischenschicht (15) angeordnet ist, deren optischer Brechungsindex kleiner ist als derjenige des Wellenleiters (4), dass die Zwischenschicht (15) eine Negativform des Halbleiterchips (3) aufweist, mit der sie direkt an den Halbleiterchip (3) angrenzt, und dass die dem Halbleiterchip (3) abgewandte, direkt an den Wellenleiter (4) angrenzende Vorderseite der Zwischenschicht (15) im Wesentlichen eben ausgebildet ist.
6. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zwischenschicht als Klebstoffschicht ausgebildet ist, vorzugsweise als Polymerschicht.
7. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Wellenleiter (4) über wenigstens eine Bondstelle mit dem Halbleiterchip (3) verbunden ist.
8. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Wellenleiter (4) als Dünnschicht ausgebildet ist, die vorzugsweise aus einem transparenten Polymerwerkstoff besteht, insbesondere aus Polystyrol.
9. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Wellenleiter (4) durch eine Metalloxidschicht gebildet ist, insbesondere eine Siliziumdioxidschicht oder eine Tantalpentoxidschicht.
10. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Strahlungsquelle (8) als Halbleiterstrahlungsquelle ausgebildet und in den Halbleiterchip (3) integriert ist.
11. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zum Einkoppeln der Anregungsstrahlung (9) in den Wellenleiter (4) im Abstrahlbereich der optischen Strahlungsquelle (8) eine Einkoppeloptik (11) vorgesehen ist, die vorzugsweise einstückig mit dem Wellenleiter (4)

ausgebildet ist und insbesondere wenigstens ein Prisma, ein optisches Gitter und/oder einen Umlenkspiegel aufweist.

- 5 12. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Strahlungsempfänger (12) vorzugsweise zeilen- oder matrixförmig nebeneinander in das Halbleitersubstrat integriert sind, dass im Detektionsbereich der einzelnen Strahlungsempfänger (12) jeweils mindestens ein, wenigstens einen Rezeptor (5) aufweisendes Detektionsfeld angeordnet ist.
- 10 13. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionsfelder derart voneinander beabstandet und relativ zu den Strahlungsempfängern (12) positioniert sind, dass die einzelnen Strahlungsempfänger (12) im Wesentlichen keine Lumineszenzstrahlung von einem Detektionsfeld eines anderen Strahlungsempfängers (12) empfangen.
- 15 14. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der wenigstens eine Rezeptor (5) in der Innenhöhlung (17) einer Durchflussmesskammer angeordnet ist, die zumindest eine Einlassöffnung (19) und eine Auslassöffnung (19) aufweist, und dass der Halbleiterchip (3) vorzugsweise einen Wandungsbereich der Durchflussmesskammer bildet.
- 20 15. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass zum Temperieren der Durchflussmesskammer eine Heiz- und/oder Kühlvorrichtung vorgesehen ist, die vorzugsweise ein Peltier-Element aufweist.
- 25 16. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass in der Durchflussmesskammer wenigstens ein Reagenz und/oder Reaktionspartner zum Nachweisen der Bindung des wenigstens einen Liganden (2) an den mindestens einen Rezeptor (5) deponiert ist.
- 30

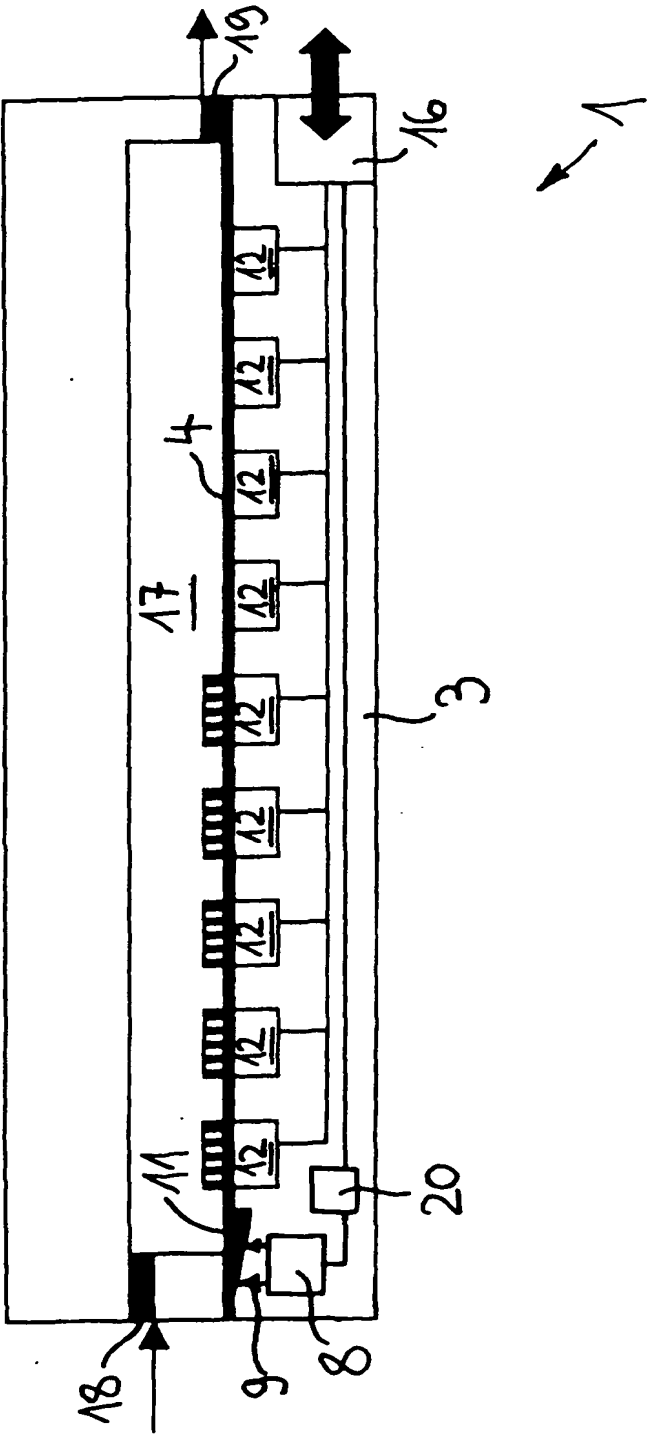
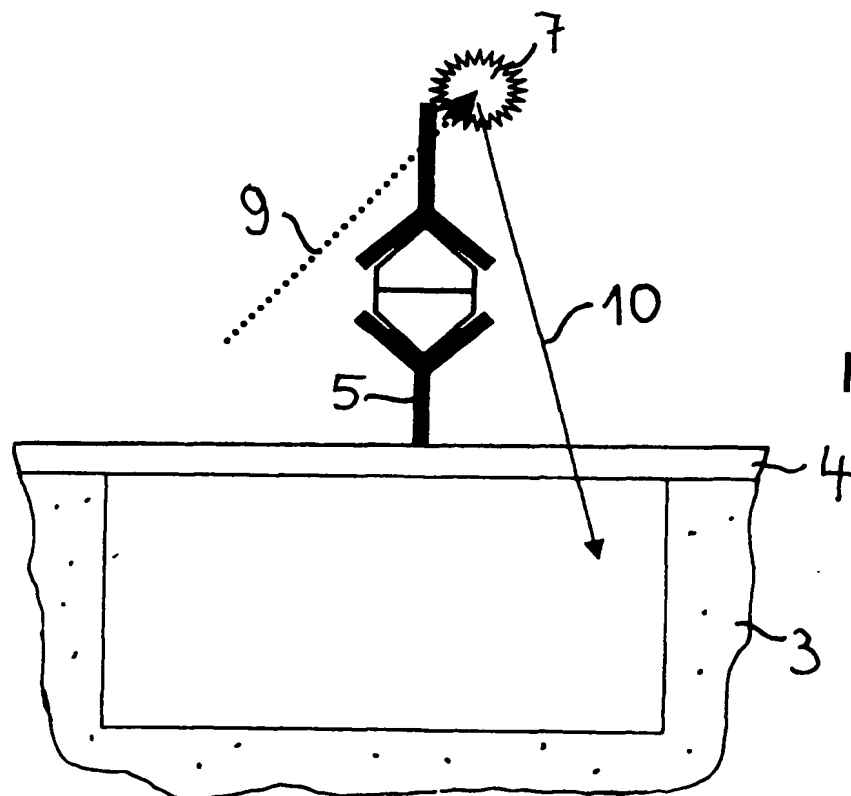
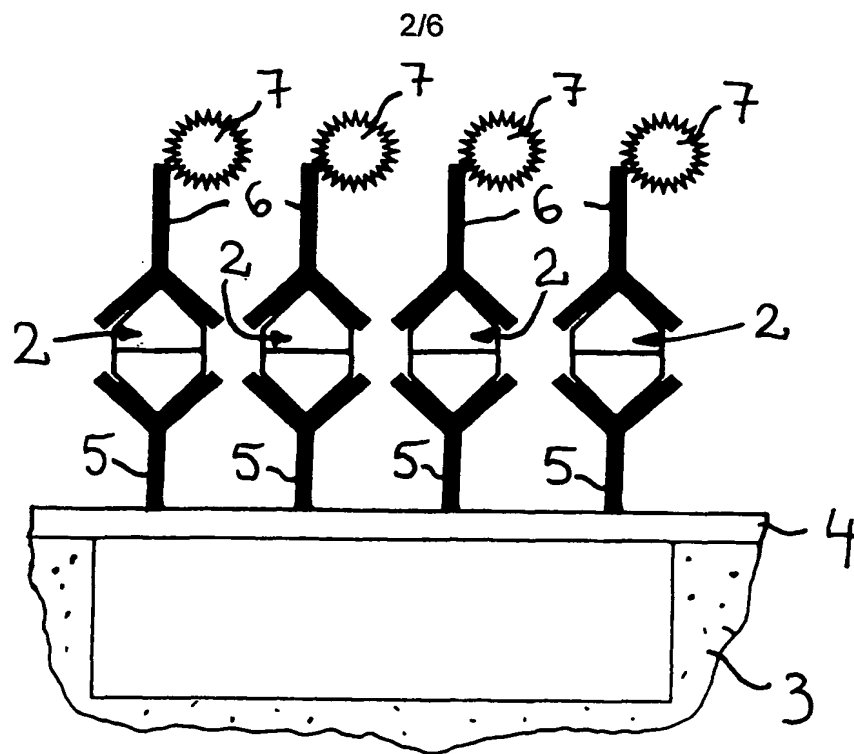


Fig. 1



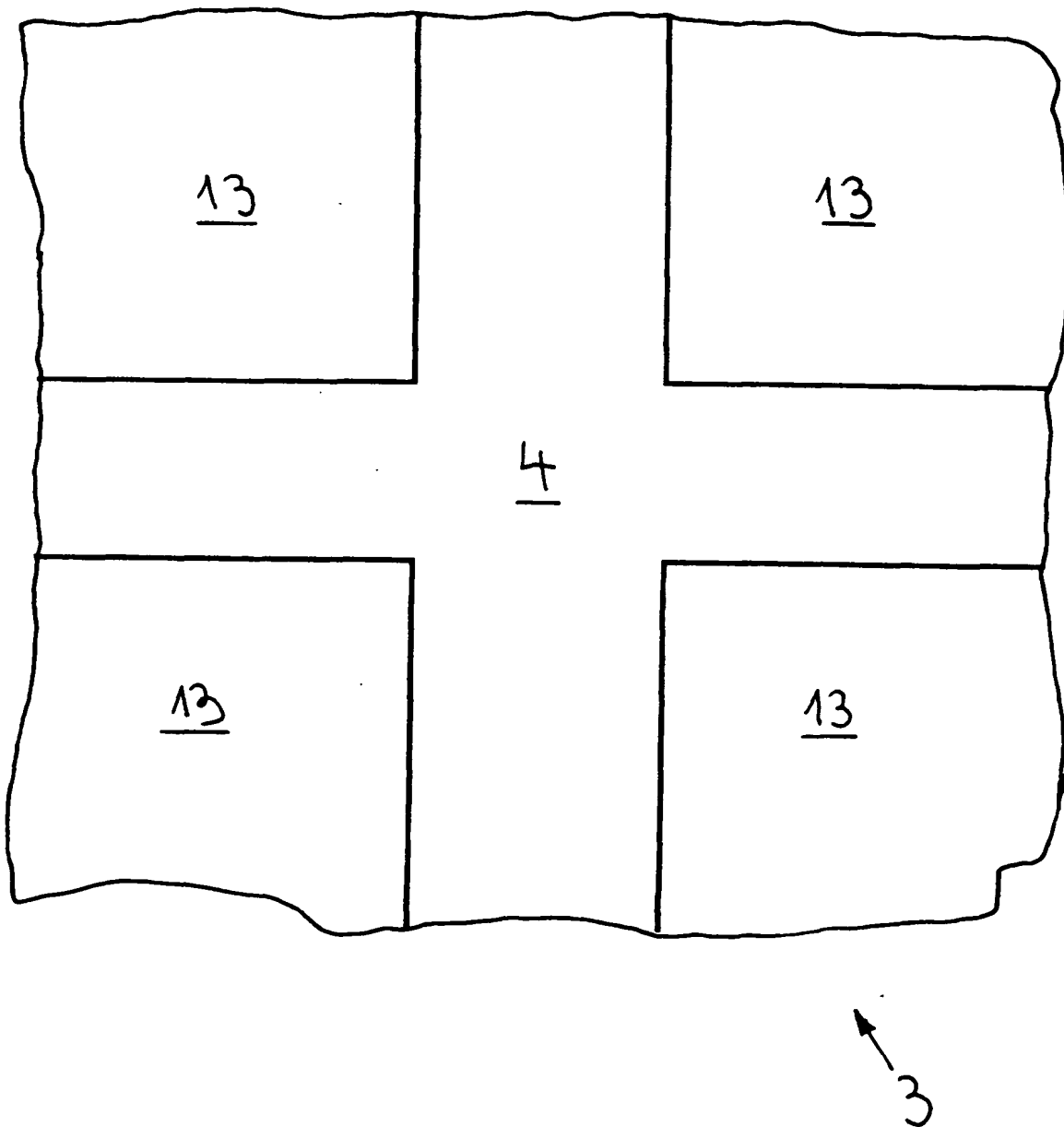


Fig. 4

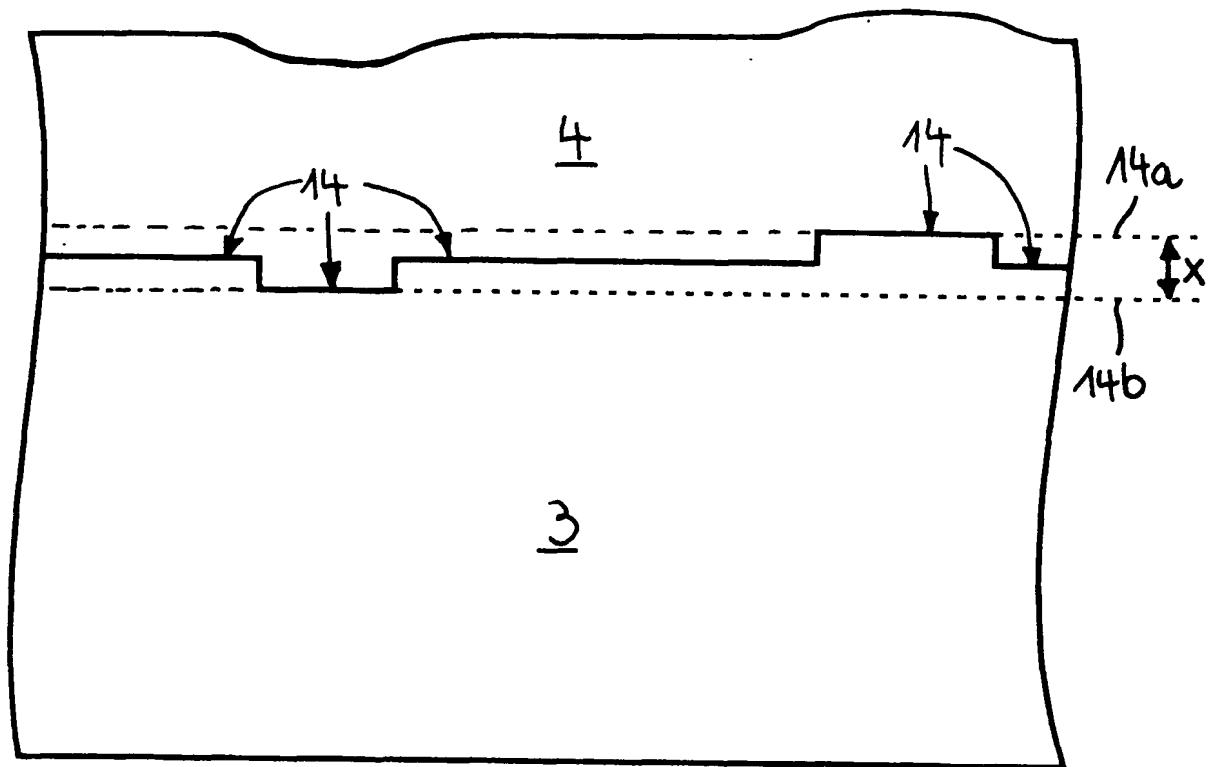


Fig. 5

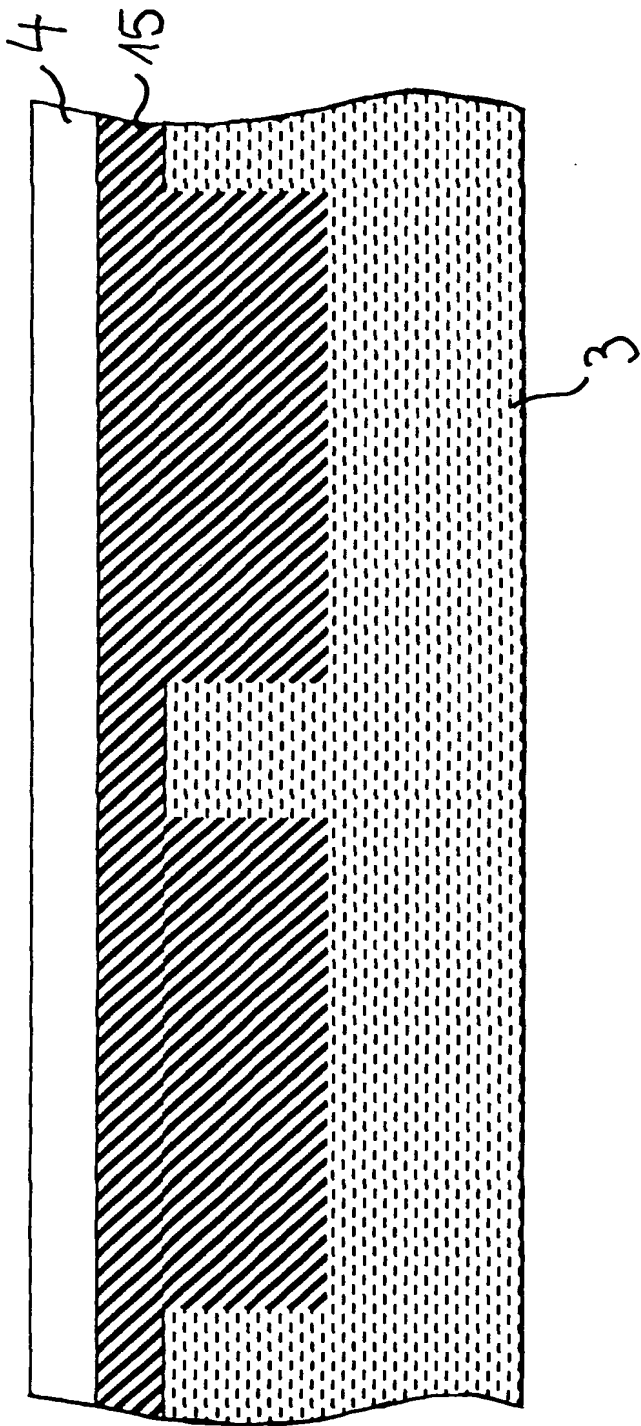


Fig. 6

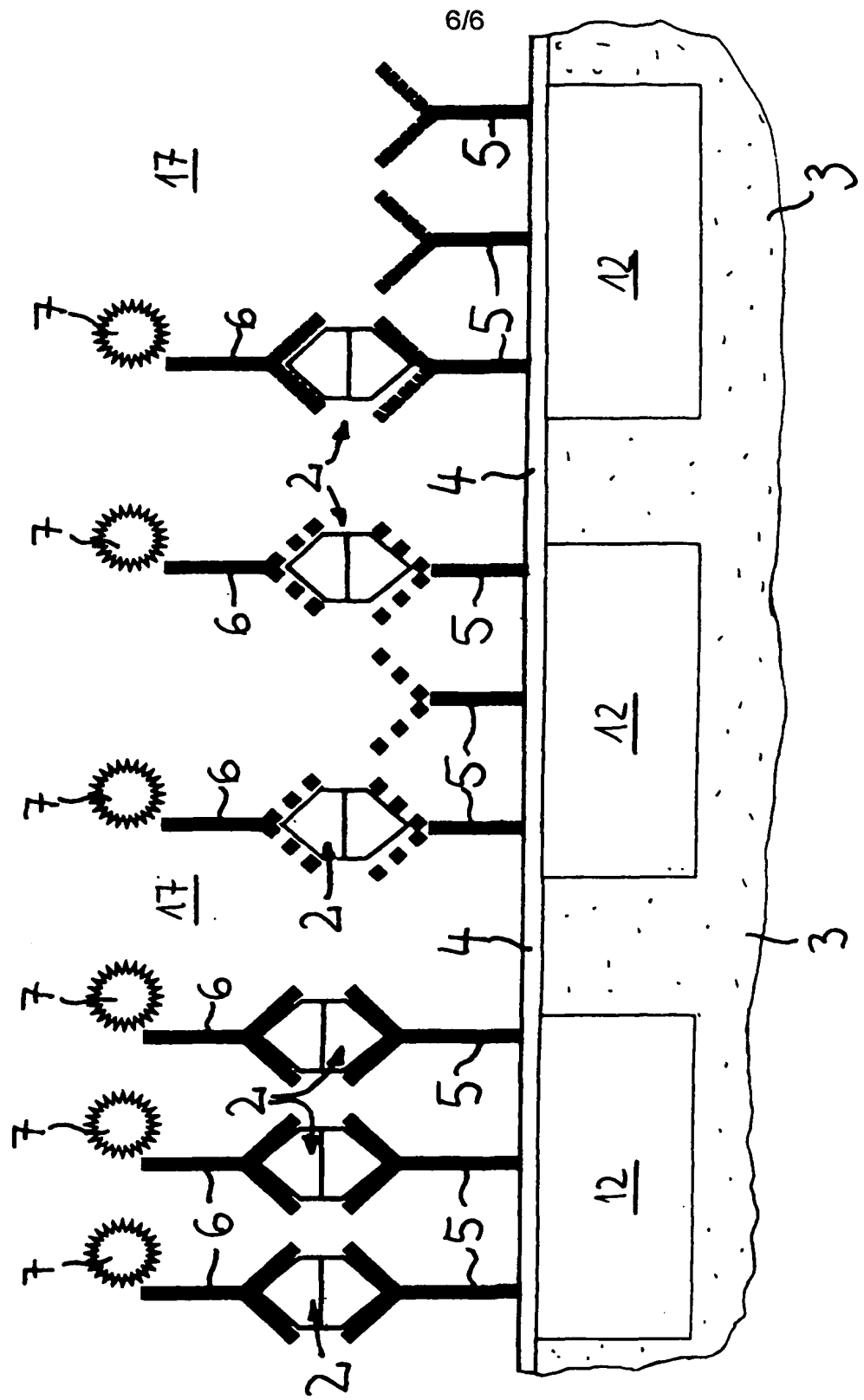


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N21/77 G01N21/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 06422 A (FIBERCHEM INC) 20 February 1997 (1997-02-20) page 3, line 7 -page 4, line 19 figures 1A,1B	1,2,5,6, 9-11,14
Y	WO 95 33197 A (CIBA GEIGY AG ;DUVENECK GERT L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRA) 7 December 1995 (1995-12-07) claims 1,5,12,20	1,2,5,6, 9-11,14
A	WO 01 84197 A (EDGE LIGHT BIOSCIENCES INC ;OPTICAL CROSSLINKS INC (US)) 8 November 2001 (2001-11-08) page 21, line 20 -page 22, line 13 claims 1,2; figure 1	1,2,8
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

20 February 2004

Date of mailing of the International search report

03/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Krametz, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10736

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 936 730 A (YU HUINAN ET AL) 10 August 1999 (1999-08-10) column 2, line 50 -column 4, line 29 figure 1 ---	1,12,13
A	WO 95 33198 A (CIBA GEIGY AG ;SCHOTT GLASWERKE (DE); ZEISS STIFTUNG (DE); DANIELZ) 7 December 1995 (1995-12-07) page 16, paragraph 3 page 17, paragraph 2 claims 1,14,31,36 ---	1,5,9,11
A	DE 199 47 616 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 3 May 2001 (2001-05-03) column 5, line 16 -column 6, line 57 claim 1; figures 2,3 -----	1,11,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/10736

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706422	A	20-02-1997	US 5650123 A	22-07-1997
			US 5737457 A	07-04-1998
			AU 6721296 A	05-03-1997
			WO 9706422 A1	20-02-1997
WO 9533197	A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
			AT 216491 T	15-05-2002
			AU 2317995 A	21-12-1995
			AU 689604 B2	02-04-1998
			AU 2734695 A	21-12-1995
			CA 2190362 A1	07-12-1995
			CA 2190643 A1	07-12-1995
			CN 1149335 A	07-05-1997
			CN 1149336 A	07-05-1997
			CZ 9603471 A3	11-06-1997
			CZ 9603472 A3	12-03-1997
			DE 69505370 D1	19-11-1998
			DE 69505370 T2	01-04-1999
			DE 69526438 D1	23-05-2002
			DE 69526438 T2	31-10-2002
			DK 760944 T3	05-08-2002
			WO 9533197 A1	07-12-1995
			EP 0759159 A1	26-02-1997
			EP 0760944 A1	12-03-1997
			ES 2174948 T3	16-11-2002
			FI 964664 A	24-01-1997
			FI 964684 A	27-01-1997
			HU 76407 A2	28-08-1997
			HU 76406 A2	28-08-1997
			WO 9533198 A1	07-12-1995
			JP 10501616 T	10-02-1998
			JP 10501617 T	10-02-1998
			PL 317379 A1	01-04-1997
			PL 317402 A1	14-04-1997
			SK 151296 A3	09-07-1997
			SK 151396 A3	09-07-1997
			US 5959292 A	28-09-1999
			US 5822472 A	13-10-1998
			ZA 9504325 A	27-11-1995
			ZA 9504327 A	27-11-1995
WO 0184197	A	08-11-2001	AU 6109401 A	12-11-2001
			CA 2407701 A1	08-11-2001
			EP 1285290 A1	26-02-2003
			JP 2003532123 T	28-10-2003
			WO 0184197 A1	08-11-2001
			US 2002110839 A1	15-08-2002
US 5936730	A	10-08-1999	WO 0014514 A1	16-03-2000
WO 9533198	A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
			AT 216491 T	15-05-2002
			AU 2317995 A	21-12-1995
			AU 689604 B2	02-04-1998
			AU 2734695 A	21-12-1995
			CA 2190362 A1	07-12-1995
			CA 2190643 A1	07-12-1995
			CN 1149335 A	07-05-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/10736

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9533198	A	CN 1149336 A	07-05-1997
		CZ 9603471 A3	11-06-1997
		CZ 9603472 A3	12-03-1997
		DE 69505370 D1	19-11-1998
		DE 69505370 T2	01-04-1999
		DE 69526438 D1	23-05-2002
		DE 69526438 T2	31-10-2002
		DK 760944 T3	05-08-2002
		WO 9533197 A1	07-12-1995
		EP 0759159 A1	26-02-1997
		EP 0760944 A1	12-03-1997
		ES 2174948 T3	16-11-2002
		FI 964664 A	24-01-1997
		FI 964684 A	27-01-1997
		HU 76407 A2	28-08-1997
		HU 76406 A2	28-08-1997
		WO 9533198 A1	07-12-1995
		JP 10501616 T	10-02-1998
		JP 10501617 T	10-02-1998
		PL 317379 A1	01-04-1997
		PL 317402 A1	14-04-1997
		SK 151296 A3	09-07-1997
		SK 151396 A3	09-07-1997
		US 5959292 A	28-09-1999
		US 5822472 A	13-10-1998
		ZA 9504325 A	27-11-1995
		ZA 9504327 A	27-11-1995
DE 19947616	A	03-05-2001	DE 19947616 A1
			WO 0125759 A1
			EP 1218727 A1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10736

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N21/77 G01N21/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 06422 A (FIBERCHEM INC) 20. Februar 1997 (1997-02-20) Seite 3, Zeile 7 -Seite 4, Zeile 19 Abbildungen 1A,1B	1,2,5,6, 9-11,14
Y	WO 95 33197 A (CIBA GEIGY AG ;DUVENECK GERT L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRA) 7. Dezember 1995 (1995-12-07) Ansprüche 1,5,12,20	1,2,5,6, 9-11,14
A	WO 01 84197 A (EDGELIGHT BIOSCIENCES INC ;OPTICAL CROSSLINKS INC (US)) 8. November 2001 (2001-11-08) Seite 21, Zeile 20 -Seite 22, Zeile 13 Ansprüche 1,2; Abbildung 1	1,2,8
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Februar 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/03/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krametz, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10736

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 936 730 A (YU HUINAN ET AL) 10. August 1999 (1999-08-10) Spalte 2, Zeile 50 -Spalte 4, Zeile 29 Abbildung 1	1,12,13
A	WO 95 33198 A (CIBA GEIGY AG ;SCHOTT GLASWERKE (DE); ZEISS STIFTUNG (DE); DANIELZ) 7. Dezember 1995 (1995-12-07) Seite 16, Absatz 3 Seite 17, Absatz 2 Ansprüche 1,14,31,36	1,5,9,11
A	DE 199 47 616 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 3. Mai 2001 (2001-05-03) Spalte 5, Zeile 16 -Spalte 6, Zeile 57 Anspruch 1; Abbildungen 2,3	1,11,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10736

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9706422	A	20-02-1997	US 5650123 A	22-07-1997
			US 5737457 A	07-04-1998
			AU 6721296 A	05-03-1997
			WO 9706422 A1	20-02-1997
WO 9533197	A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
			AT 216491 T	15-05-2002
			AU 2317995 A	21-12-1995
			AU 689604 B2	02-04-1998
			AU 2734695 A	21-12-1995
			CA 2190362 A1	07-12-1995
			CA 2190643 A1	07-12-1995
			CN 1149335 A	07-05-1997
			CN 1149336 A	07-05-1997
			CZ 9603471 A3	11-06-1997
			CZ 9603472 A3	12-03-1997
			DE 69505370 D1	19-11-1998
			DE 69505370 T2	01-04-1999
			DE 69526438 D1	23-05-2002
			DE 69526438 T2	31-10-2002
			DK 760944 T3	05-08-2002
			WO 9533197 A1	07-12-1995
			EP 0759159 A1	26-02-1997
			EP 0760944 A1	12-03-1997
			ES 2174948 T3	16-11-2002
			FI 964664 A	24-01-1997
			FI 964684 A	27-01-1997
			HU 76407 A2	28-08-1997
			HU 76406 A2	28-08-1997
			WO 9533198 A1	07-12-1995
			JP 10501616 T	10-02-1998
			JP 10501617 T	10-02-1998
			PL 317379 A1	01-04-1997
			PL 317402 A1	14-04-1997
			SK 151296 A3	09-07-1997
			SK 151396 A3	09-07-1997
			US 5959292 A	28-09-1999
			US 5822472 A	13-10-1998
			ZA 9504325 A	27-11-1995
			ZA 9504327 A	27-11-1995
WO 0184197	A	08-11-2001	AU 6109401 A	12-11-2001
			CA 2407701 A1	08-11-2001
			EP 1285290 A1	26-02-2003
			JP 2003532123 T	28-10-2003
			WO 0184197 A1	08-11-2001
			US 2002110839 A1	15-08-2002
US 5936730	A	10-08-1999	WO 0014514 A1	16-03-2000
WO 9533198	A	07-12-1995	AT 172300 T	15-10-1998
			AT 216491 T	15-05-2002
			AU 2317995 A	21-12-1995
			AU 689604 B2	02-04-1998
			AU 2734695 A	21-12-1995
			CA 2190362 A1	07-12-1995
			CA 2190643 A1	07-12-1995
			CN 1149335 A	07-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10736

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9533198	A		CN 1149336 A	07-05-1997
			CZ 9603471 A3	11-06-1997
			CZ 9603472 A3	12-03-1997
			DE 69505370 D1	19-11-1998
			DE 69505370 T2	01-04-1999
			DE 69526438 D1	23-05-2002
			DE 69526438 T2	31-10-2002
			DK 760944 T3	05-08-2002
			WO 9533197 A1	07-12-1995
			EP 0759159 A1	26-02-1997
			EP 0760944 A1	12-03-1997
			ES 2174948 T3	16-11-2002
			FI 964664 A	24-01-1997
			FI 964684 A	27-01-1997
			HU 76407 A2	28-08-1997
			HU 76406 A2	28-08-1997
			WO 9533198 A1	07-12-1995
			JP 10501616 T	10-02-1998
			JP 10501617 T	10-02-1998
			PL 317379 A1	01-04-1997
			PL 317402 A1	14-04-1997
			SK 151296 A3	09-07-1997
			SK 151396 A3	09-07-1997
			US 5959292 A	28-09-1999
			US 5822472 A	13-10-1998
			ZA 9504325 A	27-11-1995
			ZA 9504327 A	27-11-1995
DE 19947616	A	03-05-2001	DE 19947616 A1	03-05-2001
			WO 0125759 A1	12-04-2001
			EP 1218727 A1	03-07-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.